

DELPHION

[Log Out](#) [Work Files](#) [Saved Searches](#)
[RESEARCH](#) [PRODUCTS](#) [INSIDE DELPHION](#)

My Account

Search: Quick/Number Boolean Advanced Derwent

[Help](#)

51457-2000800-10361



The Delphion Integrated View: INPADOC Record

Get Now: ☒ PDF [More choices...](#)View: Jump to: Go to: [Derwent](#)Tools: Add to Work File: ☒ Email this to a friend

⌘ Title: **CN1261669A: ALBUMEN AND GENE DETECTING PLATE AND ITS PREPARING METHOD AND USE**

⌘ Derwent Title: Albumen and gene detecting plate and its preparation [\[Derwent Record\]](#)

⌘ Country: CN China

⌘ Kind: A Unexamined APPLIC. open to Public Inspection 1

⌘ Inventor: SHENGQI WANG; China

XIAOHONG WANG; China

ZONGLIANG ZOU; China

⌘ Assignee: RADIOACTIVE MEDICINE INST., ACADEMY OF MILITARY MEDICAL SCIENCES, PLA China

[News](#), [Profiles](#), [Stocks](#) and [More about this company](#)

⌘ Published / Filed: 2000-08-02 / 1999-11-19

⌘ Application Number: CN1999099123756

⌘ IPC Code: G01N 33/52;

⌘ ECLA Code: None

⌘ Priority Number: 1999-11-19 CN1999099123756

⌘ Abstract:

The present invention relates to the field of biomedical engineering. The detecting plate consists of a chip with albumen and gene segment on its surface and a grille adhered closely to the surface of the chip to separate the chip into several sample holes. The detecting plate can detect several samples simultaneously and may be also used in the analysis of antigens, antibodies and genes. Using small amount of sample to obtain large amount of diagnosis information, the present invention may have important application in clinical disease diagnosis, medicine effect evaluation, disease



High Resolution

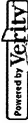
observation, medicine selection, disease-related gene analysis and other medical fields.

Family:

| PDF | Publication | Pub. Date | Filed | Title |
|-------------------------------------|-------------|------------|------------|---|
| <input checked="" type="checkbox"/> | CN1261669A | 2000-08-02 | 1999-11-19 | ALBUMEN AND GENE DETECTING PLATE AND ITS PREPARING METHOD AND USE |
| 1 family members shown above | | | | |

None

Other Abstract Info:



Nominate this for the Gallery...

THOMSON

Copyright © 1997-2005 The Thomson Corporation
Subscriptions | Web Seminars | Privacy | Terms & Conditions | Site Map | Contact Us | Help

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 99123756.0

[43]公开日 2000年8月2日

[11]公开号 CN 1261669A

[22]申请日 1999.11.19 [21]申请号 99123756.0

[71]申请人 中国人民解放军军事医学科学院放射医学研究所

地址 100850 北京市太平路27号王升启

[72]发明人 王升启 王小红 邹宗亮
管伟 林汝仙

权利要求书2页 说明书9页 附图页数3页

[54]发明名称 一种蛋白和基因检测板及其制备方法和应用

[57]摘要

本发明涉及一种蛋白和基因多功能检测板的发明及其制备方法以及在医学诊断中的应用,属于生物医学工程领域。检测板由表面固定有蛋白和基因片段的固相基质和格栅构成,格栅紧密粘贴在片基表面并将片基分隔成多个样品孔,该检测板能够同时检测多个样本,也可以用于多种抗原、抗体或基因的分析,由于用少量样品,在短时间内即可获取大量诊断信息,本发明的实施在临床疾病诊断、药物疗效评价、疾病转归预测、药物筛选及疾病相关基因分析等医药学等领域具有重要作用。

ISSN 1008-4274

1. 一种蛋白和基因检测板, 该检测板由表面固定有蛋白或基因的片基和格栅构成, 其特征在于格栅将表面固定有蛋白或基因的片基分隔成多个样品孔。
2. 根据权利要求 1 所述的检测板中格栅的形状可以是方形、长方形、圆形及椭圆形, 格栅的厚度为 0.1-20 毫米, 样品孔的数量可以为 2-48 个, 正方形样品孔边长为 4.5-11 毫米, 长方形样品孔长度为 8-22 毫米, 宽度为 6-10 毫米, 圆形样品孔直径为 5-22 毫米, 椭圆形样品孔最大直径为 7-22 毫米, 最小直径为 5-10 毫米。
3. 根据权利要求 1 所述的检测板, 其特征在于常用检测板由格栅形成 2-10 个正方形样品孔, 其边长为 9 毫米。
4. 根据权利要求 1 所述的检测板, 其特征在于作为格栅的疏水性材料是金属、塑料、橡胶或防水纸。
5. 根据权利要求 1 所述的检测板, 其特征在于样品孔内结合的抗原为血源性纯化抗原、病毒裂解抗原、重组抗原及合成肽抗原。
6. 根据权利要求 1 所述的检测板, 其特征在于样品孔内结合的抗体为单克隆抗体或抗血清。
7. 根据权利要求 1 所述的检测板, 其特征在于样品孔内结合的基因是 cDNA 片段或寡核苷酸探针
8. 根据权利要求 1 所述的检测板, 其特征在于作为片基的固相材料是玻璃片、硅片、塑料片或复合材料, 其厚度为 1 毫米, 长度为 75 毫米, 宽度为 25 毫米。
9. 根据权利要求 5、6 和 7 所述, 其特征在于设计一系列已知不同量的抗原、抗体或基因制作标准点, 作为相应抗体、抗原或基因的定量检测。
10. 根据权利要求 1 所述的检测板的制备方法, 它包括如下步骤:
 - (1) 选取特定的固相材料, 经过清洗及表面活化处理后, 切割成形状规则的片基;
 - (2) 选取疏水性材料, 用不同的模具将其制成不同形状的多孔格栅;
 - (3) 用胶将格栅固定在片基上, 制成活化的检测板;
 - (4) 将抗原、抗体或基因等识别分子分别结合在样品孔内。
11. 根据权利要求 1 所述的检测板在临床疾病诊断、药物疗效评价、

疾病转归观测、药物筛选、疾病相关基因分析中的应用。

12. 根据权利要求 11 所述的用途，其中所述的疾病诊断为传染病诊断、性病诊断、癌症等分子诊断。

7.

均 文 号

一种蛋白和基因检测板及其制备方法和应用

本发明涉及一种医学诊断用检测板、它的制备方法和用途，具体地说是一种蛋白和基因多功能检测板的结构、制备方法及它在临床诊断和科学研究中的应用。

医学诊断技术是临床及基础医学研究中的常用技术，基因和蛋白在固相支持物表面的固定技术的发展，促进了诊断检测板的产生。检测板就是具有特定形状和大小的、由经过特殊处理的硅片、玻片或塑料片等固相材料制成的板，其表面可以固定基因或蛋白分子（如抗原），用于识别和检测其他特定的基因和蛋白分子（如抗体）。检测板是医学诊断中的常用工具，以往基于检测板的诊断方法主要建立在单项反应、单一指标或分体式多项指标（如乙肝五项等）的基础上，由于反应条件存在细微差异，每次实验存在随机因素，致使检测结果难以标准化。此外，对某一个体而言，要获取大量疾病信息，在单项反应基础上需要采集大量血样，这就带来价格与时间问题。以病毒性肝炎病因的诊断为例，已明确有甲、乙、丙、丁、戊五型肝炎病毒，按目前的检测方法，需要分别采用这五型肝炎相应的抗原及抗体检测试剂盒，包括表面抗原的 ELISA 试剂盒、e 抗原的 ELISA 试剂盒、表面抗体的 ELISA 试剂盒、甲肝抗体的 ELISA 试剂盒等逐个进行单个项目的检测，至少需要 10 个以上的反应才能做出初步的临床诊断，检测过程繁琐耗时。

目前国内外虽然有一张检测板上固定多种基因或蛋白的文献，但每张检测板只能检测一个样本[Ahrendt SA, Halachmi S, Chow JT, et al. Rapid p53 sequence analysis in primary lung cancer using an oligonucleotide probe array. Proc Natl Acad Sci, USA, 1999, 96:7382-7387. Lueking A, Horn M, Eickhoff H, et al. Protein microarrays for gene expression and antibody screening. Analytical Biochemistry, 1999, 270:103-111]。既可以检测多个样本，又可以检测多种基因或蛋白的检测板尚未产生。

本发明的目的是提供一种既可以检测多个样本，又可以检测多种基因或蛋白的多功能检测板。

本发明的再一目的是提供这种检测板的制备方法。

本发明的又一目的是提供这种检测板在医学诊断中的应用。

本发明的目的是这样实现的：通过多孔格栅与表面固定有蛋白和基因片段的片基粘合，制成具有多个样品孔的检测板，检测板的片基根据不同用途可以制成不同规格，常用检测板的片基为标准规格：即长 75 毫米，宽 25 毫米，厚 1 毫米。可以用不同的模具制备不同形状的格栅，如长方形、正方形、圆形、椭圆形等等，格栅的厚度以 0.1-20 毫米为宜。不同的格栅分隔出不同形状及大小的样品孔，在检测板上的样品孔数量可以为 5-40 个，样品孔可以是正方形，边长为 4.5-11 毫米；也可以是长方形，长度为 8-22 毫米，宽度为 6-10 毫米；也可以是圆形，直径为 5-22 毫米；还可以是椭圆形，最大直径为 7-22 毫米，最小直径为 5-10 毫米。优选的检测板片基为标准规格，格栅厚度为 0.1 毫米，检测板上有 10 个正方形样品孔，样品孔边长为 9 毫米。

根据本发明的又一目的，所述检测板的制备方法如下：(1)采用特定固相材料检测板载体，经过一系列化学处理(包括清洗及表面活化等)及切割制备出特定大小的检测板活化片基(见图 1a)，(2)根据不同用途，将疏水性材料制成不同规格的检测板多孔格栅(见图 1b)，(3)用胶将格栅固定于检测板活化片基上，制成活化的多孔检测板(见图 1c)。制备检测板片基的固相材料可以是玻璃片、硅片、塑料片、滤膜或其复合材料，依载体材料的不同，可进行一系列不同的表面化学处理(Marshall A, Hodgson J. DNA chips: an array of possibilities. Nat Biotechnol, 1998, 16:27-31)，优选的片基材料为玻璃片。制作格栅的材料可为金属、塑料、橡胶或防水纸等，根据本领域的常规知识可推知的其它材料均在本发明范围内。

根据本发明的再一目的，提供了所述检测板在临床疾病诊断、药物疗效评价、疾病转归观测、药物筛选、疾病相关基因分析等方面的应用，特别是在肝炎诊断系列、性病诊断系列、癌症相关抗原

诊断中的应用。根据不同的检测目的，将适当体积、不同浓度的多种抗原、抗体或基因等识别分子点样于检测板样品孔的特定位置，这一步骤可以用机械手打印、喷印或人工点样的方法而实现。在一定反应条件下，使识别分子通过与检测板片基的共价或非共价结合而固定于样品孔内，洗涤除去未结合的识别分子，制成的检测板可直接用于检测(图 2，图 3)。用作识别分子的抗原可以是血源性纯化抗原、病毒裂解抗原、重组抗原及合成肽抗原，用作识别分子的抗体可以是单克隆抗体或抗血清。用作识别分子的基因可以是 cDNA 片段及合成的寡核苷酸探针，在优选的实施例中，设计了一系列已知不同量的抗原或抗体制作标准点，用于血清中相应抗体或抗原的定量检测。

检测时，将血清/血浆、体液(脑脊液、胸水、腹水等)及分泌物等检测样品加入样品孔，待检样本也可以是处理过的样本，如稀释的蛋白样本或提取、扩增和标记的核酸样本。在一定条件下反应特定时间后洗涤除去未结合的样本，即可进行荧光扫描分析，检测抗原/抗体时，加入不同荧光物质标记的二抗分子；随后再进行扫描分析。通过上述方法，用一个检测板一次即可获取多个样本、多种基因、抗原或抗体的信息。

由于采用了多孔格栅、不同颜色的二抗及不同组织或微生物来源的基因分别标记方法，本发明具有以下特点：(1)多样本：同一检测板上，可同时检测多个样本，如多个病人血清、组织提取物等；(2)多项目：每一样品可同时检测多个项目，如一个反应，同时可检测乙肝表面抗体、e 抗体、核心抗体、丙肝抗体、丁肝抗体、戊肝抗体等各种抗体(3)多型别：同时可明确抗体类型如 IgA、IgG、IgM 及 IgE 等；(4)多用途：可用于高通量抗原、抗体或基因定性及定量的检测；(5)样品用量极少：每一样品仅需几微升。

总之，基因和蛋白多功能检测板不仅可用于基础研究，它们在临床上的使用将使疾病的诊断模式发生重大改变，用极少量样品、在极短时间内，即可提供大量疾病诊断信息，使医务人员能全面、正确、及时地认识疾病。由于反应条件的一致性，检测方法更易标准化。因此，本发明的实施对临床诊断技术水平及认识疾病能力的提高具有重要的社会效益和经济效益。

附图简述

图 1. 检测板的制备

a: 固相载体 i: 正面图 ii: 纵切面 iii: 横切面; b1-5: 格栅;
c1-5: 活化多功能检测板

图 2. 重要传染病诊断的抗体检测板

a: 检测板; b: 定量标准及坐标; c: 各种抗原

图 3. 重要传染病诊断的抗体检测板的应用

a: 检测板; b: 定量标准及坐标; c: 各种抗原

图 4. 乙型肝炎诊断的抗原检测板

a: 检测板; b: 定量标准及坐标; c: 各种抗体

图 5. 乙型肝炎诊断的抗原检测板

a: 检测板; b: 定量标准及坐标; c: 各种抗体

实施例

为进一步说明多功能检测板的制备方法及其用途, 参照下列实施例进行说明, 这些实施例是为了解释而不是以任何方式限制本发明。

实施例一 活化生物检测板片基的制备

将标准规格的玻璃片置于重铬酸钾浓硫酸溶液中浸泡过夜, 小心弃去酸液, 用去离子水冲洗, 再置蒸馏水槽中洗 3 次后, 在氨水溶液(浓氨水: 双氧水: 水, 1: 1: 5)中浸泡 2 小时, 蒸馏水洗 3 次, 再在盐酸溶液(浓盐: 双氧水: 水, 1: 1: 5)中浸泡 2 小时, 蒸馏水洗 3 次, 浸入 1% 硅烷化试剂(硅烷化试剂 1 毫升+无水乙醇 95 毫升+蒸馏水 5 毫升+乙酸 0.1 毫升)中适当时间, 取出后用 16 毫米乙酸-95%乙醇溶液洗 2 次, 蒸馏水洗 1 次, 置 150℃烘烤 2 小时, 即获得氨基片。于干燥器皿中保存。氨基片置 3% 戊二醛溶液(25% 戊二醛 6 毫升+0.01M 磷酸缓冲液 pH8.0 44 毫升)中, 室温下作用 4-6 小时, 取出用 0.01M 磷酸缓冲液(pH7.4)洗 2 次, 蒸馏水洗 3 次, 凉干, 即为活化生物检测板片基, 室温下保存。

实施例二 活化多功能检测板的制备

1. 以塑料为疏水性材料, 用方形模具制得格栅如图 1-b1, 将其紧密粘贴于活化生物检测板片基表面, 制成的多功能检测板如图

- 1-c1 所示, 检测板上有正方形样品孔 10 个, 每个样品孔边长为 9 毫米。
2. 以橡胶为疏水性材料, 用长方形模具制得格栅如图 1-b2, 将其紧密粘贴于活化生物检测板片基表面, 制成的多功能检测板如图 1-c2 所示, 检测板上有长方形样品孔 5 个, 每个样品孔长为 22 毫米, 宽为 9 毫米。
 3. 以防水纸为疏水性材料, 用椭圆形模具制得格栅如图 1-b3, 将其紧密粘贴于活化生物检测板片基表面, 制成的多功能检测板如图 1-c3 所示, 检测板上有椭圆形样品孔 5 个, 每个样品孔最大直径为 1.5 毫米, 最小直径为 9 毫米。
 4. 以金属为疏水性材料, 用方形模具制得格栅如图 1-b4, 将其紧密粘贴于活化生物检测板片基表面, 制成的多功能检测板如图 1-c4 所示, 检测板上有正方形样品孔 40 个, 每个样品孔边长为 4.5 毫米。
 5. 以橡胶为疏水性材料, 用圆形模具制得格栅如图 1-b5, 将其紧密粘贴于活化生物检测板片基表面, 制成的多功能检测板如图 1-c5 所示, 检测板上有圆形样品孔 10 个, 每个样品直径为 9 毫米。

实施例三 检测板的应用

(一). 抗体检测板

根据临床检测的需要及方便实用的目的, 可用不同的抗原组合排列制作成各种抗体检测板。在此仅举一例说明抗体检测板的制作及应用。将肝炎系列纯化抗原(HAV 抗原(裂解抗原)、HBs 抗原(adw, 血源性/ad, 重组/ay, 重组)、HBe 抗原(重组)、HBc 抗原(a. a. 183/a. a. 180, 重组)、乙肝 Pre-S1 肽(合成肽)、HCV 抗原(C/NS-3/NS-4a+b, 重组)、HDV 抗原(重组)及 HEV 抗原(重组)和性病系列抗原(HIV 抗原(GP120/GP41/GP36/GP120+41/GP120+41+36, 重组)、TP 抗原(15/47, 重组)、HSV 抗原(重组))[购自 Advanced I 毫米 unochemical 和 Biodesign 公司] 用 0.02M 磷酸缓冲液(pH8.0) 以适当的比例稀释, 按 5×7 的阵列, 通过机械手(美国 Biodot 公司产 Cartesian technologies 点样仪), 打印或喷印于多功能检测板孔内, 同时以人 IgG 和 IgM 按不同的稀释度浓度依次顺序排列在两侧, 以标识抗原位置并作为浓度对照以进行定量分析。4℃过夜, 以

便抗原及人 IgG 和 IgM 与检测板发生共价结合,再用含 1%BSA 的 0.1M Tris-HCl 缓冲液(pH8.5),37℃,封闭 1 小时,用含 1%吐温-20 的 0.01M 磷酸缓冲液(pH7.4)洗涤后,即为一块重要传染病诊断的抗体检测板,见图 2,各点的抗原种类见表 1,各孔的阵列相同,每一孔代表不同患者血清。密封在 4℃保存备用。

表 1 重要传染病诊断的抗体检测板各点的抗原坐标

| 点坐标 | 抗原及 类型 | 点坐标 | 抗原及 类型 | 点坐标 | 抗原及 类型 | 点坐标 | 抗原及 类型 | 点坐标 | 抗原及 类型 |
|--------|----------------|----------|------------------|----------|-----------|--------|--------------------|--------|--------------|
| (2, b) | HBsAg (adw) | (3, b) | HBcAg (aa180) | (4, b) | HDVAg | (5, b) | HIVAg 120+41/36 | (6, b) | TPAg (15) |
| (2, c) | HBsAg (ad) | (3, c) | HBcAg (aa183) | (4, c) | HEVAg | (5, c) | HIVAg gp120+41 | (6, c) | TPAg (47) |
| (2, d) | HBsAg (ay) | (3, d) | HCVAg (NS-3) | (4, d) | HAVAg | (5, d) | HIVAg (gp120) | (6, d) | HSVAg |
| (2, e) | HBeAg | (3, e) | HCVAg | (4, e) | HBeAg | (5, e) | HIVAg | | |
| | | (NS-4+6) | | (Pre-S1) | | (gp36) | | | |

应用时,将患者血清及阴性与阳性对照血清用 0.05M Tris-HCl(pH8.5)缓冲液适当稀释后加至检测板样品孔内,37℃,反应 1 小时,用含 1%吐温-20 的 0.01M 磷酸缓冲液(pH7.4)洗三次,蒸馏水洗二次,加入适当比例稀释的 Cy3 或 Cy5 标记的鼠抗人 IgG(Cy3·IgG 或 Cy5·IgG)及 Cy5 或 Cy3 标记的鼠抗人 IgM(Cy5·IgM 或 Cy3·IgM),37℃,反应 1 小时,含 1%吐温-20 的 0.01M 磷酸缓冲液(pH7.4)洗三次,蒸馏水洗二次,凉干。采用 ScanArray3000 荧光扫描仪(美国 General Scanning 公司)检测(channel 1 扫描检测 Cy3 荧光,channel 2 扫描检测 Cy5 荧光)及 ImaGene 分析软件分析。结果如图 3 所示可见相应疾病对应的抗原位置出现荧光亮点且根据荧光强度及荧光标记二抗类型可明确抗体的浓度及类型,各孔加入的患者血清情况见表 2。

(二). 抗原检测板

将纯化抗体鼠抗人 HBs 单克隆抗体、鼠抗人 HBe 单克隆抗体及鼠抗人 HBc 单克隆抗体(购自 Advanced I 毫米 unochemical 公司)用 0.02M 磷酸缓冲液(pH8.0)以适当的比例稀释,按 4×4 阵列,通过机械手,打印或喷印于多功能检测板孔内,同时将不同浓度的标准抗原排列在阵列两侧以标识抗体位置及进行定量分析,4℃过夜,以便抗体及标准抗原与检测板发生共价结合,再用含 1%BSA 的 0.1M

Tris-HCl 缓冲液 (pH8.5), 37℃, 封闭 1 小时, 含 1% 吐温-20 的 0.01M 磷酸缓冲液 (pH7.4) 洗涤后, 即为乙型肝炎抗原检测板, 见图 4, 各表 2 检测板各孔加入的患者血清情况

| 检测孔 | 患者血清 | 检测孔 | 患者血清 |
|-----|--------|-----|---------|
| A1 | 乙肝患者血清 | B1 | 甲肝患者血清 |
| A2 | 丙肝患者血清 | B2 | 艾滋病患者血清 |
| A3 | 丁肝患者血清 | B3 | 梅毒患者血清 |
| A4 | 戊肝患者血清 | B4 | 单疱患者血清 |
| A5 | 阴性对照血清 | B5 | 阳性对照血清 |

点的抗体位置为 (2, b/c/d): 鼠抗 HBs 单克隆抗体; (3, b/c/d): 鼠抗 HBe 单克隆抗体; (4, b/c/d): 鼠抗 HBc 单克隆抗体, 各孔的阵列相同, 每一孔加入不同患者血清。密封在 4℃ 保存备用。

应用时, 将患者血清及阴性与阳性血清用 0.05M Tris-HCl (pH8.5) 适当稀释后加至乙型肝炎抗原检测板孔内, 37℃, 反应 1 小时, 用含 1% 吐温-20 的 0.01M 磷酸缓冲液 (pH7.4) 洗三次; 蒸馏水洗二次, 加入适当比例稀释的 Cy3 标记的混合特异性检测抗体, 37℃, 反应 1 小时, 用含 1% 吐温-20 的 0.01M 磷酸缓冲液 (pH7.4) 洗三次, 蒸馏水洗二次, 凉干, 采用 ScanArray3000 荧光扫描仪检测及 ImaGene 软件分析。结果如图 5 所示, A5 为阴性对照, B5 为阳性对照, 不同患者情况可在相应的抗原位置出现荧光亮点, 如 A2 为 HBs 抗原与 HBe 抗原阳性患者, B3 为 HBs 抗原阳性患者等, 并可根据荧光亮度确定抗原浓度。

(三). 基因检测板

1. 结肠癌 ras 基因点突变的检测

Ras 基因是参与结肠癌发生的主要癌基因之一, 人 K-ras 癌基因的激活是由于基因编码的蛋白质序列的点突变所致, 最常见的点突变位置是第 12 位密码子的甘氨酸、第 13 位密码子的赖氨酸和第 61 位密码子的谷酰胺。设计与合成同 K-ras 基因第 12 位、第 13 位、第 61 位编码子野生型及各种突变型互补的 15mer 寡核苷酸探针其序列见表 3, 5' 端用 C₆-NH₂ 连接臂, 用 OPC 柱纯化及 HPLC 监控质量。

将一定浓度的探针溶解在点样液中,按 5×5 阵列,通过机械手,打印或喷印于多功能检测板孔内,室温放置 3 小时,0.2%SDS 洗二次,

表 3 K-ras 基因突变检测的探针序列

| 突变位点 | 性质 | 序 列 | 序号 | 坐 标 |
|-----------|-----|---|----|--------|
| 第 12 位编码子 | 野生型 | 5' NH ₂ -C ₆ -TACGCCACCAGCTCC | 1 | (2, b) |
| | 突变型 | 5' NH ₂ -C ₆ -TACGCCACAAGCTCC | 2 | (2, c) |
| | | 5' NH ₂ -C ₆ -TACGCCATCAGCTCC | 3 | (2, d) |
| | | 5' NH ₂ -C ₆ -TACGCCAACAGCTCC | 4 | (2, e) |
| | | 5' NH ₂ -C ₆ -TACGCCACGAGCTCC | 5 | (3, b) |
| | | 5' NH ₂ -C ₆ -TACGCCACTAGCTCC | 6 | (3, c) |
| 第 13 位编码子 | 野生型 | 5' NH ₂ -C ₆ -CCTACGCCACCAGCT | 7 | (3, d) |
| | 突变型 | 5' NH ₂ -C ₆ -CCTACGCCAACAGCT | 8 | (3, e) |
| | | 5' NH ₂ -C ₆ -CCTACGTCACCAGCT | 9 | (4, b) |
| | | 5' NH ₂ -C ₆ -CCTACGCTACCAGCT | 10 | (4, c) |
| 第 61 位编码子 | 野生型 | 5' NH ₂ -C ₆ -CTCCTCTTGACGTGC | 11 | (4, d) |
| | 突变型 | 5' NH ₂ -C ₆ -CTCCTCATGACGTGC | 12 | (4, e) |
| | | 5' NH ₂ -C ₆ -CTCCTCTAGACGTGC | 13 | (5, b) |
| | | 5' NH ₂ -C ₆ -CTCCTCTGACGTGC | 14 | (5, c) |

双蒸水洗二次,用含 3%(w/v)NaBH₄的磷酸盐(pH7.4)-乙醇(4:1, v/v)溶液封闭 20 分钟,0.2%SDS 洗二次,双蒸水洗二次,室温干燥,即为 ras 基因点突变检测的基因检测板。

应用时,从结肠癌肿瘤组织中提取 DNA,用 Cy3 或 Cy5 标记引物进行 PCR 扩增,扩增后产物用乙醇沉淀,再溶解于杂交液中,密封后,在 42℃ 杂交反应 30-120 分钟,然后用高严谨盐溶液洗涤,凉干后,采用 ScanArray3000 荧光扫描仪检测及 ImaGene 软件分析。结果可见结肠癌相关 ras 基因点突变位分别可见相应的阳性点,而未突变基因信号较弱,据此可分析组织是否存在点突变及变异位点。

2. 病毒性肝炎的基因诊断

根据各型肝炎病毒保守区序列设计合成一系列引物,采用患者血清或克隆载体为模板,通过 PCR 或 RT-PCR 获得各型肝炎病毒的 cDNA 片段,纯化后,用上述相同的方法进行基因检测板的制备,但采用氨基化的多功能检测板或涂抹多聚赖氨酸的多功能检测板。

应用时,将患者血清或组织裂解,离心后,取上清,采用 Cy3 或 Cy5 标记的引物通过 PCR 扩增或通过 Cy3/Cy5-dNTPs 掺入法(Zhu Z,

Waggoner AS. Molecular mechanism controlling the incorporation of fluorescent nucleotides into DNA by PCR. *Cytometry*, 1997, 28:206-211. Rogers YH, Jiang-Baucom P, Huang ZJ, et al. I 毫米 obilization of oligonucleotides onto a glass support via disulfide bonds: a method for preparation of DNA microarrays. *Anal Biochem*, 1999, 266(1):23-30), 制备靶核酸产物。将靶核酸溶解于杂交液中, 均匀平铺在检测板孔内, 在合适的温度与时间条件下, 进行杂交反应, 然后用高严谨盐溶液洗涤, 凉干后, 采用 ScanArray3000 荧光扫描仪检测及 ImaGene 软件分析。结果可见相应疾病的对应点出现荧光亮点, 阴性血清或组织来源核酸无相应荧光信号或仅有较弱的荧光信号。

说明书附图

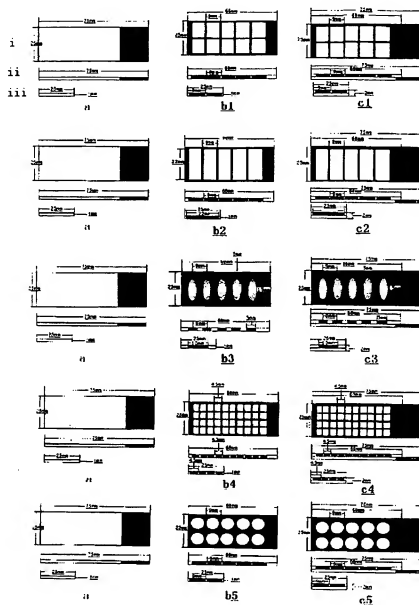
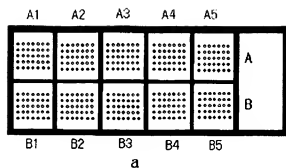


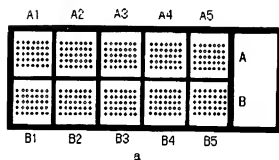
图 1



.....
IgM
.....
IgG
b

.....
.....
.....
.....
.....
.....
1234567
c

图 2



.....
IgM
.....
IgG
b

.....
.....
.....
.....
.....
.....
1234567
c

图 3

